

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12P 17/10 // (C12P 17/10, C12R 1:01) (C12P 17/10, C12R 1:645)		A1	(11) 国際公開番号 WO98/23769
			(43) 国際公開日 1998年6月4日 (04.06.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04300			(81) 指定国 CN, CZ, HU, IL, KR, SG, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) 国際出願日 1997年11月26日 (26.11.97)			
(30) 優先権データ 特願平8/331468	1996年11月26日 (26.11.96)	JP	添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘淵化学工業株式会社(KANEKA CORPORATION)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 八十原良彦(YASOHARA, Yoshihiko)[JP/JP] 〒670 兵庫県姫路市日出町3-7-2-605 Hyogo, (JP) 長谷川淳三(HASEGAWA, Junzo)[JP/JP] 〒674 兵庫県明石市大久保町高丘2丁目13-4 Hyogo, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 安富康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.) 〒532 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番22号 リクルート新大阪ビル4階 Osaka, (JP)			

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF N-BENZYL-3-PYRROLIDINOL

(54) 発明の名称: N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法

(57) Abstract

A process for preparing optically active N-benzyl-3-pyrrolidinol efficiently by reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone stereoselectively through an enzymatic reaction. The process is one which comprises reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone stereoselectively through an enzymatic reaction conducted in a two-layer system composed of an aqueous layer containing an enzyme and an organic layer capable of forming a two-layer system together with the aqueous layer.

(57) 要約

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供する。

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元することによる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、前記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行う光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AU アルゼンチン	FI フィンランド	LT リトアニア	SL ヒネギルト
AM アルメニア	FR フランス	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
AT オーストリア	GA ガボン	LV ラトビア	TC チャード
AU オーストラリア	GAE ギャニ	MC モナコ	TR トゴ
AU オセレバディヤン	GCH ギルジア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GGM ギニア	MG マダガスカル	TM ハルクメニスタン
BB ベルバドス	GHN ギニアビサウ	MK マケドニア旧ユーゴス	TT トルコ
BE ベルギー	GJN ギニアビサウ	LA ラヴィア共和国	TA トリンダック・トバゴ
BF ブルキナ・ファソ	GRG ギニア	ML マリ	UG ブラジナ
BG ブルガリア	HDR ハンガリー	MN モンゴル	UA ヴაკანდა
BR ベナン	HDE ハンドネシア	MK モロッコ	US 米国
BR ブラジル	HEL アイルラン	MW マラウイ	VE ベキスタン
BY ベラルーシ	ISL イスラエル	MX メキシコ	VI ヴィエトナム
CA カナダ	ISR イスラエル	NE ニジェール	YU ユーロースラヴィア
CF 中央アフリカ	JCP イタリア	NL ナランダ	ZW ジンバブエ
CG コンゴ共和国	JP 日本	NO ノルウェー	
CM コートジボアール	KCP ケニア	NZ 新西兰	
CM ウメルーン	KR 北朝鮮	PT ポルトガル	
CN 中国	KR 韓国	RU ローランド	
CY キューバ	LA フスタン	SD シューダン	
CZ キプロス	LC セントルシア	SG シンガポール	
CZ チェコ	LK シリランカ	SI シリヴニヤ	
DK 德国	LS スリベリア	SK シスラヴィア	
ES デンマーク	LT レント	SV シエラ・レオネ	
ES エストニア			
ES スペイン			

明細書

N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法

技術分野

本発明は、 β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品の合成中間体として有用な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法に関する。

背景技術

光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、医薬品の合成中間体として有用である。光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、光学活性な化合物から合成する方法や、プロキラルな化合物から出発して不斉合成又は光学分割する方法等が知られている。このような方法として、特開平6-141876号公報には、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、このN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法が開示されている。しかしながら、この方法はその基質仕込濃度及び基質から生成物への転換率が低く、実用に耐えるものではなかった。

発明の要約

本発明は、上記に鑑み、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供することを目的とするものである。

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元することによる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、前記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行う光学活性なN-ベンジル-3-ピロリジノール製造方法である。

本発明者らは、酵素反応の基質となるN-ベンジル-3-ピロリジノンの酵素反応条件下すなわち水中での安定性について調べたところ、非常に不安定であることを見い出した。このことは、酵素反応中にも基質が分解し結果として生成物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールへの転換率が低下することを意味している。また、生成物であるN-ベンジル-3-ピロリジノールについても同様の調査を行なったところ、酵素反応条件下すなわち水中でも安定であった。本発明者らは、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンの安定化方法について鋭意検討した結果、N-ベンジル-3-ピロリジノンは、有機溶媒中では安定に存在すること、並びに、水層及び有機溶媒層が同時に存在する二層系中では安定に存在することを見い出した。この現象は、水層と有機溶媒層との二層系中では、N-ベンジル-3-ピロリジノンは大部分が有機溶媒層中に溶解しているため、不安定さをもたらす要因である水との接触機会が減少し、結果としてより安定に存在できるためと説明される。

同様に酵素反応の生成物であるN-ベンジル-3-ピロリジノールも水層と有機溶媒層との二層系中では大部分が有機溶媒層中に存在している。一方、酵素や酵素活性発現に必要な諸成分、例えば、補酵素、エネルギー源等は、一般に水溶性化合物であるため、大部分が水層に存在すると予測できる。従って、基質や生成物との接触機会が減少するため、酵素反応一般で引き起こされる基質や生成物による酵素活性の阻害、それによる低基質仕込濃度及び酵素反応転換率の低下の軽減も期待できる。

更に、本発明者らは、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素を用いる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法において、反応系中に酵素を含んだ水層及びこの水層と二層を形成する有機溶媒層を同時に存在させれば、酵素を含んだ水中のみで反応をおこなった場合と比較して、得られるN-ベンジル-3-ピロリジノールの光学純度が向上することも見い出した。

発明の詳細な開示

以下に本発明を詳述する。

本発明においては、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元する。

上記N-ベンジル-3-ピロリジノンは、特開昭54-16466号公報に開示されている方法で合成することができる。すなわち、ベンジルアミンとアクリル酸エチルとをマイケル付加させることにより得られる β -アラニン誘導体に、塩基の存在下クロロ酢酸エチルを反応させる。得られる化合物を金属ナトリウム存在下で環化させ、N-ベンジル-4-カルボエトキシ-3-ピロリドンを得る。このものを塩酸により脱炭酸してN-ベンジル-3-ピロリジノンを得ることができる。

本発明においては、上記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、上記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行う。

上記酵素としては、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する能力を有するものであれば特に限定されず、例えば、特開平6-141876号公報に例示されている酵素等を挙げることができる。また、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する能力を有する微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を用いることもできる。

上記微生物としては特に限定されず、例えば、デポダスカス (D e p o d a s c u s) 属、デバリオマイセス (D e b a r y o m y c e s) 属、クリプトコッカス (C r y p t o c o c c u s) 属、ピキア (P i c h i a) 属、ロードスパリテウム (R h o d s p o r i d i u m) 属、トリコスパロン (T r i c h o s p o r o n) 属、コマガタエラ (K o m a g a t a e l l a) 属、オガタエア (O g a t a e a) 属、チゴサッカロマイセス (Z y g o s a c c h a r o m y c e s) 属、エシェリヒア (E s c h e r i c h i a) 属、マイクロコッカス (M i c r o c o c c u s) 属、ショートモナス (P s e u d o m o n a s) 属、カンドィダ (C a n d i d a) 属、サッカロマイコブシス (S a c c h a r o m y c o p s i s) 属、パシゾレン (P a c h y s o l e n) 属等に属する微生物等を挙げることができる。このような微生物は一般に、入手又は購入が容易な保存株から得ることができる。また、自然界から分離することもできる。なお、これらの微生物に変異を生じさせてより本反応に有利な性質を有する菌株を得ること

もできる。また、これら微生物から組換えDNA、細胞融合等の遺伝子工学、生物工学的手法により誘導されるものであってもよい。

上記菌体の処理物としては特に限定されず、例えば、菌体の乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体又は菌体からの抽出酵素標品等を挙げることができる。

上記培養物の処理物としては特に限定されず、例えば、培養物の濃縮物、乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物等を挙げることができる。更に、培養菌体、培養物より酵素を精製し、これを使用してもよい。

上記有機溶媒層を構成する有機溶媒としては、水層と二層を形成し、上記N-ベンジル-3-ピロリジノン及び生成物であるN-ベンジル-3-ピロリジノールを溶解し、上記酵素の活性を低下させないものであれば特に限定されず、例えば、酢酸エステル、酪酸エステル等のエステル類；1-ブタノール、1-オクタノール等のアルコール類；ベンゼン、トルエン等の芳香族類；ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル等のエーテル類；クロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素類；n-ヘキサン、n-デカン等の脂肪族炭化水素類；メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等のケトン類等を挙げることができる。これらの有機溶媒は、温度、pH等の反応条件による分配率と安定性とを考慮して適宜選んで使用される。

上記二層系中における水層と上記有機溶媒層との比率は特に制限されないが、重量基準で、95/5～5/95の範囲が好ましい。

上記酵素反応による上記N-ベンジル-3-ピロリジノンの立体選択性的還元は、具体的には、上記酵素を含んだ水性媒体と上記有機溶媒とを混合し、攪拌又は振盪することによって行うことができる。

上記酵素反応には、上記酵素以外に補酵素として還元型ニコチニアミド・アデニジヌクレオチド(NADH)、還元型ニコチニアミド・アデニジヌクレオチドリノ酸(NADPH)等を必要とするので、反応系にこれらを添加するか、NADH、NADPH等を生成する反応システムを反応系に添加する必要がある。例えば、ギ酸脱水素酵素がギ酸から二酸化炭素と水とを生成する際にNADからNADHを生成する反応や、グルコース脱水素酵素がグルコースからグルコノ

ラクトンを生成する際にNADからNADH又はNADPからNADPHを生成する反応を利用することができます。また、上記微生物が自身の菌体内に本来有している補酵素の生成システムをそのまま用いることもできる。

上記酵素反応は、反応温度0～70°C、pH4～9の条件で行うことが好ましい。より好ましくは、20～50°Cである。上記酵素反応に有する時間は、用いる基質濃度、酵素量、補酵素量、反応温度等によって異なるが、通常、1～10時間である。また、上記酵素反応は、有機溶媒層と水層とが混合する程度に攪拌して行なうことが好ましいが、その攪拌強度は、用いられる有機溶媒の種類、有機溶媒層と水層との比率、反応の進み具合等により、適宜決定される。

上記酵素反応終了後、有機溶媒層を集めて、脱水後、有機溶媒を留去して目的の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを得ることができる。更に、シリカゲルクロマトグラフィーや蒸留等により精製することで高純度の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを得ることができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

実施例1

N-ベンジル-3-ピロリジノン10mgを栓付き試験管に秤りとり、100mMりん酸緩衝液(pH6.5)0.5mlと表1に示した有機溶媒0.5mlとを加えよく攪拌した。これと同じものを3本用意し、うち1本は攪拌後直ちに酢酸エチル4mlと炭酸水素ナトリウムを水層が飽和になるまで加えた後よく攪拌した。この有機層の一部をガスクロマトグラフィーに供し、N-ベンジル-3-ピロリジノン量を分析した。残りの2本の試験管は、30°Cでそれぞれ1.8時間と4.2時間振盪した後、同様にN-ベンジル-3-ピロリジノンを定量した。表1に0時間目のN-ベンジル-3-ピロリジノン濃度を100%としたときの1.8時間後、4.2時間後のN-ベンジル-3-ピロリジノンの残存率を示した。

ガスクロマトグラフィー測定条件：カラム：UniportB、10%PEG-20M、4.0mmID×1.0m、カラム温度：200°C、キャリヤーガス

; 窒素、検出; FID

表 1

有機溶媒	有機溶媒中のN-ベンジル-3-ピロリジノン量 (0時間)	残存率 (%)	
		18時間	42時間
酢酸エチル	10.3 mg	100	94
酢酸n-ブチル	9.3 mg	98	95
クロロホルム	10.2 mg	101	97
塩化メチレン	11.1 mg	103	100
トルエン	8.5 mg	100	94
ベンゼン	8.8 mg	97	93
1-オクタノール	7.6 mg	96	84
1-ブタノール	7.2 mg	93	23
メチルイソブチルケトン	8.0 mg	98	92
t-ブチルメチルエーテル	8.7 mg	101	56
n-ヘキサン	7.0 mg	80	46
n-デカン	6.0 mg	102	92
有機溶媒なし		62	46
緩衝液なし (酢酸エチルのみ)		103	104

実施例 2

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に 5 ml ずつ分注して、120 °Cで 20 分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成：

グルコース	4	%
酵母エキス	0.3	%
KH ₂ PO ₄	0.1	%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.35	%

N a C l	0.	1	%
M g S O ₄ · 7 H ₂ O	0.	8	%
Z n S O ₄ · 7 H ₂ O	0.	0 6	%
F e S O ₄ · 7 H ₂ O	0.	0 9	%
C u S O ₄ · 5 H ₂ O	0.	0 0 5	%
M n S O ₄ · 4 ~ 6 H ₂ O	0.	0 1	%
水道水			
p H 7. 0			

これらの液体培地に表2に示す微生物を1白金耳接種して、30℃で24~72時間振盪培養した。つぎに、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を100mMりん酸緩衝液(pH 6.5)1mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

反応液組成：

(1) 上記菌体懸濁液	0. 5 ml
(2) グルコース	5. 4 mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドりん酸	0. 275 mg
(4) グルコース脱水素酵素(天野製薬社製)	2. 84 units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1 mg
(6) 酢酸ブチル	0. 5 ml

上記の(1)~(6)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、各反応液に3.5mlの酢酸エチルを加えてよく混合し遠心分離ののち有機層中の生成物量を、実施例1に示したガスクロマトグラフィー法により定量した。また、生成物の光学純度をHPLCにより測定した。

HPLC分析条件：カラム：Chiraiice I OB(タイセル化学工業社製)、溶離液；n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン=99/1/0.1、検出：254 nm、流速：1 ml/min、溶出時間；(R)体6.1分、(S)体7.9分

表2に生成物への変換率と生成物の光学純度をまとめた。

表 2

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (% e e)
ピキア・メンプランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0182	5.4	(S) 97
ピキア・メンプランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0186	3.4	(S) 98

比較例 1

実施例 2 と同様に微生物の菌体懸濁液を調製し、反応に酢酸ブチルを添加せずに反応をおこなった。その結果を表 3 にまとめた。

表 3

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (% e e)
ピキア・メンプランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0182	2.8	(S) 78
ピキア・メンプランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0186	1.5	(S) 94

実施例 3

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に 1.0 ml 分注して、120 °C で 20 分間蒸気殺菌をおこなった。

培地組成：

肉エキス	1. 0 %
ペプトン	1. 0 %
酵母エキス	0. 5 %
N a C l	0. 3 %
水道水	
p H 7. 0	

この液体培地にエシェリヒア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) IFO 12734を1白金耳接種して、30°Cで24時間振盪培養した。つぎに、培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を100mMりん酸緩衝液(pH 6.5) 2mlに懸濁させて実施例2に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例2と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は20%、光学純度は(S) 59%eeであった。

比較例2

実施例3と同様にエシェリヒア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) IFO 12734の菌体懸濁液を調製し、反応に酢酸ブチルを添加せずに反応をおこなったところ、変換率は7%、光学純度は(S) 58%eeであった。

実施例4

表4に示した微生物について実施例2と同様の操作を行ない、その結果を表4にまとめた。

表 4

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
デボダスカス・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	50	(S) 37
デバロマイセス・ハンセニ・パレテ・ハンセニ IFO 0728 (<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	100	(S) 99
キャンディダ・マルトーサ (<i>Candida maltosa</i>) IFO 1976	34	(R) 26
キャンディダ・トロピカリス (<i>Candida tropicalis</i>) IFO 1401	26	(S) 46
キャンディダ・ユティリス (<i>Candida utilis</i>) IAM 4815	32	(S) 28
キャンディダ・ボイディニー (<i>Candida boidinii</i>) IFO 10035	35	(S) 46
クリプトコッカス・アルビダス IFO 0378 (<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	42	(S) 6
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0182	54	(S) 97
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0186	34	(S) 98
ロードスボリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	32	(S) 100
サッカロマイコプシス・リポリティカ (<i>Saccharomyopsis lipolytica</i>) IFO 0746	39	(S) 98
サッカロマイコプシス・リポリティカ (<i>Saccharomyopsis lipolytica</i>) IFO 1437	32	(S) 98
トリコスporon・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	28	(S) 98
トリコスporon・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) IFO 1199	24	(S) 97
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	24	(S) 97
オガタエア・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	26	(S) 100
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	24	(S) 88

実施例 5

表 5 に示した微生物について実施例 3 と同様の操作を行ない、その結果を表 5 にまとめた。

表 5

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (% e e)
エシェリシア・コリ (<i>Escherichia coli</i>) IFO 12734	20	(S) 59
エシェリシア・コリ (<i>Escherichia coli</i>) IFO 3806	29	(S) 49
ミクロコッカス・ルテウス (<i>Micrococcus luteus</i>) IFO 13867	34	(S) 98
シュードモナス・ディミニータ (<i>Pseudomonas diminuta</i>) IFO 12697	29	(R) 95

実施例 6

実施例 3 に示した組成からなる液体培地を調製し、500 ml 容坂口フラスコに 100 ml 分注したものを 25 本用意し、120 °C で 20 分間蒸気殺菌をおこなった。この各々に、実施例 3 と同様にして培養したシュードモナス・ディミニータ (*Pseudomonas diminuta*) IFO 12697 の培養液 2 ml を無菌的に接種して、30 °C で 24 時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し 100 mM りん酸緩衝液 (pH 6.5) 500 ml に懸濁した。これに N-ベンジル-3-ビロリジノン 5 g とグルコース 10 g、還元型ニコチンアミドアデニン・シヌクレオチドりん酸（興人社製） 275 mg、グルコース脱水素酵素（大野製薬社製） 1420 units、酢酸ブチル 500 ml を加えて 30 °C で 24 時間攪拌して反応させた。反応液の pH は 6.5 苛性ソーダ水溶液で 6.5 に保った。反応後、反応液に酢酸エチル 2.5 L を加えて抽出し、水層をさらに酢酸エチル 1 L で抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣を蒸留して N-ベンジル-3-ビロリジノール 1 g を得た。収率 20 %、光学純度 95 % e e (R) 体、沸

点 $132 \sim 137^{\circ}\text{C}$ / 3 mmHg、旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +3, 73^{\circ}$ (CH_3OH , $\text{C} = 5$)。 $^1\text{H-NMR}$ δ (CDCl_3) : 1. 63 - 1. 76 (1 H, m)、2. 09 - 2. 21 (1 H, m)、2. 26 - 2. 37 (1 H, m)、2. 51 - 2. 64 (2 H, m)、2. 75 - 2. 85 (1 H, m)、3. 38 (1 H, br s)、3. 61 (2 H, s)、4. 24 - 4. 33 (1 H, m)、7. 19 - 7. 37 (5 H, m)。

実施例 7

実施例 2 に示した組成からなる液体培地を調製し、500 mL 容坂口プラスコに 50 mL 分注したものを 50 本用意し、120°C で 20 分間蒸気殺菌をおこなった。この各々に、実施例 2 と同様にして培養したピキア・メンブランファシエンス (Pichia membranae faciens) IFO 0182 の培養液 1 mL を無菌的に接種して、30°C で 24 時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し 100 mM りん酸緩衝液 (pH 6.5) 500 mL に懸濁した。これに N-ベンジル-3-ピロリジノン 5 g とグルコース 10 g、還元型ニコチニアミドアデニン・ジヌクレオチドりん酸（興人社製）275 mg、グルコース脱水素酵素（天野製薬社製）1420 units、酢酸ブチル 500 mL を加えて 30°C で 48 時間攪拌して反応させた。反応液の pH は 6 N 命性ソーダ水溶液で 6.5 に保った。反応後、反応液に酢酸ブチル 2.5 L を加えて抽出し、水層をさらに酢酸エチル 1 L で抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチル/メタノール = 2/1）に供して精製し (S)-N-ベンジル-3-ピロリジノール 2.5 g を得た。収率 4.9%、光学純度 9.6% ee、沸点 $132 \sim 137^{\circ}\text{C}$ / 3 mmHg、旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +3, 73^{\circ}$ (CH_3OH , $\text{C} = 5$)。 $^1\text{H-NMR}$ δ (CDCl_3) : 1. 63 - 1. 76 (1 H, m)、2. 09 - 2. 21 (1 H, m)、2. 26 - 2. 37 (1 H, m)、2. 51 - 2. 64 (2 H, m)、2. 75 - 2. 85 (1 H, m)、3. 38 (1 H, br s)、3. 61 (2 H, s)、4. 24 - 4. 33 (1 H, m)、7. 19 - 7. 37 (5 H, m)。

実施例 8

実施例 2 に示した組成からなる液体培地を調製し、500 ml 用 E 坂口プラスコに 50 ml 分注したものを 50 本用意し、120 °C で 20 分間蒸気殺菌をおこなった。この各々に、実施例 2 と同様にして培養したトリコスporon・ファーメンタンス (Trichosporon fermentans) ATCC 10675 の培養液 1 ml を無菌的に接種して、30 °C で 24 時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し 100 mM りん酸緩衝液 (pH 6.5) 500 ml に懸濁した。これを氷冷下ブラウンの細胞破碎器により菌体を破碎後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とし、下記の反応液成分として使用した。

反応液組成：

(1) 上記無細胞抽出液	0.5 ml
(2) グルコース	5.4 mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドりん酸	0.26 mg
(4) グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製)	2.84 units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1 mg
(6) 酢酸ブチル	0.5 ml

上記の (1) ~ (6) を試験管に分注して混合し、振盪しながら 30 °C で 20 時間反応させた。反応後、実施例 1 と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は 4 %、光学純度は (S)-99% ee であった。

産業上の利用可能性

本発明の N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法は、上述の構成からなるので、光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノールを効率的に、かつ、工業的規模で生産することが可能である。また、本発明により得られる光学活性 N-ベンジル-3-ピロリジノールは、光学純度が高いものであり、β-ラクタム系抗生素質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品として有用な化合物の重要な中間体である。

請求の範囲

1. N-ベンジル-3-ピロリジノンを酵素反応により立体選択的に還元することによる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、前記酵素反応を、酵素を含んだ水層、及び、前記水層と二層を形成する有機溶媒層からなる二層系中で行うことを特徴とする光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。
2. 有機溶媒層が、エステル類、アルコール類、芳香族類、エーテル類、ケトン類、脂肪族炭化水素類又はハロゲン化炭化水素類からなるものである請求の範囲1記載の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P17/10 // (C12P17/10, C12R1:01), (C12P17/10, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P17/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 6-141876, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), May 24, 1994 (24. 05. 94) (Family: none)	1
Y		2
A	JP, 54-16466, A (Shionogi & Co., Ltd.), February 7, 1979 (07. 02. 79) (Family: none)	1 - 2
A	JP, 5-219967, A (E.R. Squibb & Sons, Inc.), August 31, 1993 (31. 08. 93) & EP, 538693, A2 & US, 5393663, A	1 - 2

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
February 23, 1998 (23. 02. 98)

Date of mailing of the international search report

March 3, 1998 (03. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/04300

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12P17/10 // (C12P 17/10, C12R 1:01), (C12P17/10,
C12R 1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12P17/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 6 - 1 4 1 8 7 6, A (協和醸酵工業株式会社) 24. 5月. 1 9 9 4 (24. 05. 94) (ファミリーなし)	1
Y		2
A	J P, 5 4 - 1 6 4 6 6, A (塩野義製薬株式会社) 7. 2月. 1 9 7 9 (07. 02. 79) (ファミリーなし)	1-2
A	J P, 5 - 2 1 9 9 6 7, A (E. R. S Q U I B B & S O N S, I N C O R P O R A T E D) 31. 8月. 1 9 9 3 (31. 08. 93) & E P, 5 3 8 6 9 3, A 2 & U S, 5 3 9 3 6 6 3, A	1-2

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するため引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって以前と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 23. 02. 98	国際調査報告の発送日 03.03.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 齊藤 真由美 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3449